

? S PN=DD 294711

S3 1 PN=DD 294711

? T 3/3,AB/1

3/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008953467

WPI Acc No: 1992-080736/\*199211\*

XRAM Acc No: C92-037404

**N-acyl hydroxamic ester as irreversible enzyme inhibitors - for peptide hydrolase, lipase, etc., useful diagnostically and therapeutically, e.g. as antiviral agent**

Patent Assignee: LUTHER-UNIV HALLE-W (UYHA-N)

Inventor: BARTH A; DEMUTH H U; FISCHER G; SCHIERHORN A

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DD 294711	A	19911010	DD 340991	A	19900525	199211 B

Priority Applications (No Type Date): DD 340991 A 19900525

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 294711	A		5		

Abstract (Basic): DD 294711 A

The use of the new inhibitors of formula (I) for inhibiting the catalytic activity of enzymes, and as diagnostic agents for these enzymes is new.

$R1-C(O)-NH-O-C(O)-R2$  (I)

R1CO is the residue of an amino acid or peptide (both opt. N-substd. by alkoxycarbonyl, aralkoxycarbonyl, alkanoyl, cycloalkylcarbonyl, aralkanoyl, aroyl, heterocyclylcarbonyl, alkylsulphonyl, arylsulphonyl, monoaralkylcarbamoyl, cinnamoyl, alpha-aralkoxycarbonylaminoalkanoyl; or where the N-substit. completes a cyclic amide; the amino acid or peptidyl residue components, are L- or D-amino acids found in proteins, or they are non-protein or substd. amino acids), residues of aliphatic, branched, aromatic (opt. substd.) or heterocyclic acyl (e.g. aralkoxycarbonyl, alkanoyl, cycloalkylcarbonyl, aralkanoyl, aroyl, heterocyclylcarbonyl, alkylsulphonyl, arylsulphonyl, monoaralkylcarbamoyl, cinnamoyl or alpha-aralkoxycarbonylaminoalkanoyl, collectively Ra).

R2CO = aliphatic, branched or opt. substd. aromatic acyl (e.g. benzoyl opt. substd. by F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, Me or MeO) or heterocyclic acyl (such as Ra above); or a prim. or sec. amine, such as (branched) aliphatic, heterocyclic or aromatic (opt. substd.) amines, including C-protected or unprotected amino acids and peptides; D- and other non-protein or substd. amino acids which can also be peptide components, e.g. Sarcosine, N-methylalanine, dehydroalanine, aziridine- or azetidine- carboxylic acid, dehydroproline or amino-benzoic acid.

USE/ADVANTAGE - (I) are irreversible inhibitors of enzymes involved in cleavage, formation and isomerisation of ester and peptide bonds (esp. peptide hydrolases, lipases, esterases, syntheseses or transacylases) in normal and pathological body fluids, tissues, etc.orm



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 234 711 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1

Patentgesetz der DDR

vom 27.10.1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 C 259/04

C 07 K 5/04

## DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 07 C / 340 991 6

(22) 25.05.90

(44) 10.10.91

(71) siehe (73)

(72) Barth, Alfred, Prof. Dr.; Demuth, Hans-Ulrich, Dr. Dipl.-Biochem.; Fischer, Gunther, Doz. Dr. Dipl.-Chem.;  
Schiernhorn, Angelika, Dr. Dipl.-Chem., DE

(73) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Universitätsplatz 10, O - 4010 Halle, DE

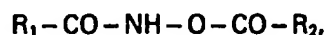
(54) Neue irreversible Inhibitoren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Enzymen und Verfahren zu ihrer Herstellung

(55) Inhibitoren; Enzyme; Hydrolasen; Proteasen; Aminosäurederivate; Peptidderivate; irreversible Hemmung; Diagnostika; Therapeutika; Pharmaka

(57) Die Erfindung dient der Entwicklung, Herstellung und Anwendung von hochwirksamen, irreversiblen Inhibitoren zur Hemmung unerwünschter Aktivität von Enzymen, die im Zuge ihrer katalytischen Einwirkung auf Substrate Esterbindungen spalten und knüpfen sowie Peptidbindungen spalten, isomerisieren und synthetisieren können. Die Erfindung bezieht sich auf Diacyl Hydroxylaminderivate der allgemeinen Formel  $R_1-CO-NHO-CO-R_2$ . Ziel der Erfindung ist ein leicht anwendbares Verfahren zur Kontrolle der Aktivität von Enzymen in deren gereinigter Form sowie in normalen und pathologisch veränderten Körperflüssigkeiten, Organen, Geweben, Zellen sowie Zellkulturen menschlicher, tierischer, mikrobieller, viraler Herkunft sowohl in vitro als auch in vivo und zur synthetischen Gewinnung der Inhibitoren. Dabei kann der Rest  $R_1-CO-$  für Aminosäure- oder N-geschützte Aminosäurereste sowie N-geschützte Peptidylreste oder N-ungeschützte Peptidylreste stehen, wobei die N-Schutzgruppen Alkoxycarbonyl, Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclylcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbonyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen bzw. gemeinsam mit dem Stickstoffatom gebildete cyclische Amide darstellen können und wobei die Aminosäuren bzw. die Bestandteile der Peptidylreste proteinogene L- und D-Aminosäuren oder andere nichtproteinogene oder substituierte Aminosäuren sein können bzw. aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische substituierte und heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkonoyl, Aroyl, Heterocyclylcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbonyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen darstellen.  $R_2-CO-$  steht für aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische substituierte Acylreste wie z. B. Benzoylreste mit Substituenten in ortho-, meta- oder para-Stellung oder Substituentenkombinationen in diesen Stellungen, vorzugsweise der Atome bzw. Gruppierungen F, Cl, Br,  $NO_2$ ,  $NH_2$ ,  $CH_3$ ,  $CH_3O$  und substituierte und unsubstituierte heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclylcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbonyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen. Dabei kann  $R_2$  auch primäre oder sekundäre Amine repräsentieren (wie aliphatische, verzweigte aliphatische oder heterocyclische oder aromatische, substituierte und unsubstituierte Amine, einschließlich von C-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäuren und Peptiden, D- und anderen z. B. nichtproteinogenen bzw. substituierten Aminosäuren, wie z. B. Sarcosin, N-Methylalanin, Dehydroalanin, Aziridincarbonsäure, Azetidincarbonsäure, Dehydroprolin, Aminobenzoessäure, die auch Bestandteile der Peptide sein können). Die Erfindung ist für die Medizin, Immunbiochemie und die pharmazeutische Industrie zur Anwendung als Diagnostika, Therapeutika oder Pharmaka von Bedeutung.

**Patentanspruch:**

1. Verwendung von neuen Inhibitoren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Enzymen und als Diagnostika für diese Enzyme, gekennzeichnet durch Verbindungen der allgemeinen Formel I



wobei der Rest  $R_1-CO-$  für:

- Aminosäure- oder N-geschützte Aminosäurereste sowie N-geschützte Peptidylreste oder N-ungeschützte Peptidylreste, wobei diese N-Schutzgruppen Alkoxycarbonyl, Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen bzw. gemeinsam mit dem Stickstoffatom gebildete cyclische Amide darstellen können, und wobei die Aminosäuren bzw. die Bestandteile der Peptidylreste proteinogen L- und D-Aminosäuren oder andere nichtproteinogene oder substituierte Aminosäuren sein können;
- aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische substituierte und heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen;

$R_2-CO-$  für:

- aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische substituierte Acylreste wie z. B. Benzoylreste mit Substituenten in ortho-, meta- oder para-Stellung oder Substituentenkombinationen in diesen Stellungen, vorzugsweise der Atome bzw. Gruppierungen F, Cl, Br,  $NO_2$ ,  $NH_2$ ,  $CH_3$ ,  $CH_3O$  und substituierte und unsubstituierte heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen, bzw. für: primäre oder sekundäre Amine, wie für aliphatische, verzweigte aliphatische oder heterocyclische oder aromatische, substituierte und unsubstituierte Amine, einschließlich von C-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäuren und Peptiden, D- und anderen z. B. nichtproteinogenen bzw. substituierten Aminosäuren, die auch Bestandteile der Peptide sein können wie z. B. Sarcosin, N-Methylalanin, Dehydroalanin, Aziridincarbonsäure, Azetidincarbonsäure, Dehydroprolin, Aminobenzoesäure steht.

2. Verfahren zur Beeinflussung der Aktivität von Enzymen durch neue, mechanisch-orientierte Inhibitoren der allgemeinen Formel I, gekennzeichnet dadurch, daß die inhibitorisch aktive Form des Inhibitors während der Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor generiert wird und entweder ein carbonylaktives Isocyanat, ein Carbonylnitrenium, ein Carbonylnitren oder einen Acylrest darstellt.
3. Verfahren zur Herstellung neuer, mechanismus-orientierter Inhibitoren für Enzyme, gekennzeichnet dadurch, daß ihre Darstellung ausgehend von  $R_1-CO-NHOH$  vorzugsweise durch Einführung der O-Acylfunktion ( $R_2-CO-$ ) mittels Carbonyldiimidazol als Kupplungsreagenz und der entsprechenden Carbonsäure  $R_2-COOH$  und im Falle der Einführung von Carbaminsäurederivaten (als O-Acylgruppierungen,  $R_2-CO-$ ) über die Darstellung eines aktivierten Carbaminsäurenitrophenylesters und dessen nachfolgender Reaktion mit der gereinigten Acylhydroxamsäure  $R_1-CO-NHOH$  zum gewünschten Diacyl Hydroxylamin der allgemeinen Formel I erfolgt.

4. Verwendung von neuen, mechanismus-orientierten Inhibitoren für Enzyme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß diese oder pharmazeutisch formulierte Komplexe zur irreversiblen Hemmung der katalytischen Aktivität von Peptidhydrolasen, Lipasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen, die sowohl kovalente als auch nichtkovalente Zwischenprodukte mit ihren Substraten während der Katalyse bilden und zur Ausprägung ihrer Aktivität u. a. katalytisch aktive Serin-, Cystein- oder Aspartatreste enthalten oder mit Hilfe von Metallionen katalytisch wirksam sind, in ihrer gereinigten Form oder in normalen und pathologisch veränderten Körperflüssigkeiten, Organen, Geweben, Zellen sowie Zellkulturen menschlicher, tierischer, mikrobieller, viraler Herkunft als Diagnostika, Therapeutika oder Pharmaka zur Anwendung gelangen.

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Entwicklung von mechanismus-orientierten, irreversibel wirkenden Inhibitoren für Enzyme, die im Zuge ihrer katalytischen Einwirkung auf Substrate Esterbindungen und Peptidbindungen spalten, isomerisieren sowie knüpfen können.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen wirken u. a. auf die Aktivität von Peptidhydrolasen (Proteasen, Proteinasen, Peptidasen), Lipasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen, die sowohl kovalente als auch nichtkovalente Zwischenprodukte mit ihren Substraten während der Katalyse bilden und zur Ausprägung ihrer Aktivität u. a. katalytisch aktive Serin-, Cystein- und Aspartatreste enthalten oder mit Hilfe von Metallionen katalytisch wirksam sind.

Inhibitoren derartiger Enzyme dienen dazu, deren unerwünschte Aktivität in verschiedenen pathologischen Zuständen, bei Fermentationsprozessen in der Lebensmittelindustrie, unter Laborbedingungen wirksam zu unterdrücken.

Die Erfindung ist zur Anwendung als Pharmaka bei der Therapie verschiedener Erkrankungen in der Humanmedizin, Veterinärmedizin, Pharmakologie, als Feinchemikalien in der Biotechnologie, Biochemie, Immunbiochemie, Molekularbiologie, Genetik, Pharmazie, Lebensmittelindustrie und für die pharmazeutische Industrie geeignet.

#### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die selektive Hemmung von Enzymen (insbesondere von Peptidhydrolasen) zu therapeutischen, wissenschaftlichen und technischen Zwecken gelingt bisher insbesondere durch den Einsatz reversibler Inhibitoren, die durch langwierige Verfahren aus mikrobiellem, tierischem und pflanzlichem Material isoliert werden müssen (Proteinase Inhibitors, Katunuma, N., Umezawa, H., Holzer, K., Hrg., Springer-Verlag, Berlin, 1983) sowie durch synthetische Substanzen wie Statinpeptide, Cephalosporine, Haloenolactone, Peptidboronsäuren und Peptidaldehyde (Design of Enzyme Inhibitors as Drugs, Sandier, M., Smith, H. J., Hrg., Oxford University Press, Oxford (1989)).

Um eine selektive Inhibierung zu erreichen, müssen oft sehr aufwendige synthetische Verfahren zur Anwendung gebracht werden. So erfolgt die Synthese eines immunsuppressiv wirksamen Inhibitors des Cyclophilins durch verlustreiche Kondensation von vier Struktursegmenten zu einem 23gliedrigen Ringsystem Stinson, S., Chem. Eng. News. 67, 6, 1989, 29-30). Andererseits besitzen verschiedene Inhibitoren wie Peptidyl halomethylketone, Peptidaldehyde, Peptidyl-N-Nitrosamide aktivierte Carbonyl- bzw. Methylengruppen, die die Stabilität der Verbindungen in biologischen Material stark einschränken und darüber hinaus unspezifisch u. a. sehr mutagen wirken (Methods in Enzymology, Bd. XLVI, Academic Press, New York 1977, 3-240 und Fittkau, S., Jahreis, G., Peters, K., and L. Balaspiri, J. Prakt. Chem. 328, 1986, 529-538).

Darauf hin wurde von uns ein leicht anwendbares, robustes Verfahren entwickelt, daß zur spezifischen Hemmung der katalytischen Aktivität von Peptidhydrolasen führt, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxylgruppen im Substrat benötigen und katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten (Fischer, G., Demuth, H.-U., Barth, A., DD 158 109, 1982).

Mit den (diesem Verfahren entsprechenden) Verbindungen der Struktur N-Peptidyl-O-Benzoyl Hydroxylamine, gelingt die selektive Inhibierung von Serinproteasen (Demuth, H.-U., Baumgratz, R., Schaper, C., Fischer, G., and Barth, A. J. Enzyme Inhibition 2, 1988, 129-142) und von Cysteinproteasen (Smith, R. A., Coles, P. J., Spencer, R. W., Copp, L. J., Jones, C. S., and Krantz, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 155, 1988, 1201-1207).

#### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, hochwirksame, irreversible Inhibitoren für die Hemmung der Aktivität von Enzymen (vorzugsweise Peptidhydrolasen, Lipasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen) auf der Basis der Diacyl Hydroxylamine zur Verfügung zu stellen, die sich als leicht herstellbare, hochwirksame und selektiv wirkende Substanzen durch Variation ihrer Reste R<sub>1</sub> zweckgebunden, zur graduellen Abstufung ihrer Stabilität, Applizierbarkeit, Bioverfügbarkeit und inhibitorischen Potenz insbesondere in der medizinischen Therapie und Diagnose einsetzen lassen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

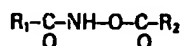
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue irreversible Inhibitoren für Enzyme (insbesondere Peptidhydrolasen) vom Typ der Diacyl Hydroxylamine zu entwickeln.

Das von uns oben beschriebene, eingeführte Verfahren definierte den N-Peptidylrest der Verbindungen als  $\alpha$ -Aminosäure-, N-geschützten  $\alpha$ -Aminosäure- oder Peptidylrest und den Benzoylrest mit Substituenten oder Substituentenkombinationen in ortho-, meta- oder para-Stellung, vorzugsweise F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>O.

Untersuchungen zum Mechanismus der Inaktivierung der Serinpeptidase Dipeptidyl Peptidase IV mittels Inhibitoren der oben genannten Struktur, lassen aber erwarten, daß das Wirkprinzip weit über die von uns in der Patentschrift DD 158109 beschriebenen Strukturen und Zielenzyme hinausgeht (Demuth, H.-U., Naumann, U., and Barth, A., J. Enzyme Inhibition, 2, 1989, 239-248) und damit die Verwendbarkeit von Verbindungen a) weitergehender struktureller Variationen in Verfahren zur Hemmung von Enzymen mit b) auch, anderen Eigenschaften als denen der kovalent katalysierenden Peptidhydrolasen mit katalytisch aktiven Cystein- und Serinresten ermöglicht. Das schließt auch Enzyme ein, deren Substrate C-terminal freie Carboxylgruppen tragen, die durch die ursprüngliche Patentschrift ausdrücklich ausgeschlossen worden waren. Es wurden zur Herstellung dieser Strukturen neuartige Syntheseverfahren entwickelt, die sich im Vergleich zu den bisherigen durch Reduzierung der Syntheseschritte und leichtere Zugänglichkeit der Strukturvariationen und deren Produkte sich weiterhin durch folgende Vorteile auszeichnen:

1. Einfache Molekülstruktur
2. Leichte synthetische und damit billige Zugänglichkeit
3. Fähigkeit durch einfachste Strukturvariationen hohe Selektivität zu erzielen
4. Fähigkeit durch geeignete Wahl der Substituenten
  - a) die Lebensdauer der Verbindungen
  - b) die Bioverfügbarkeit der Verbindungen
  - c) die Transportierbarkeit der Verbindungen zu beeinflussen
5. Universellere Anwendbarkeit auf verschiedene Enzymklassen nicht nur auf Proteasen, die Cystein- und Serinreste zur Katalyse benötigen.

Diese Eigenschaften werden erfindungsgemäß durch Verbindungen der allgemeinen Formel I



erfüllt, wobei der Rest  $R_1\text{--CO--}$  steht für:

- Aminosäure- oder N-geschützte Aminosäurereste sowie N-geschützte Peptidylreste oder N-ungeschützte Peptidylreste; wobei diese N-Schutzgruppen Alkoxy-carbonyl, Aralkoxy-carbonyl, Alkanoyl, Cycloalkyl-carbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclyl-carbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkyl-carbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxy-carbonylaminoalkanoyl Gruppierungen bzw. gemeinsam mit dem Stickstoffatom gebildete cyclische Amide darstellen können; und wobei die Aminosäuren bzw. die Bestandteile der Peptidylreste proteinogen L- und D-Aminosäuren oder andere nichtproteinogene oder substituierte Aminosäuren sein können.
- aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische substituierte und heterocyclische Acylreste wie Aralkoxy-carbonyl, Alkanoyl, Cycloalkyl-carbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclyl-carbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkyl-carbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxy-carbonylaminoalkanoyl Gruppierungen.

**R<sub>7</sub>-CO-** steht für:

- aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische substituierte Acylreste, wie z. B. Benzoylreste mit Substituenten in ortho-, meta- oder para-Stellung oder Substituentenkombinationen in diesen Stellungen, vorzugsweise der Atome bzw. Gruppierungen F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>O und substituierte und unsubstituierte heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclylcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbonyl, Cinnamoyl, α-Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen.
- Dabei kann R<sub>2</sub> auch stehen für:  
primäre oder sekundäre Amine (wie für aliphatische, verzweigte aliphatische oder heterocyclische oder aromatische, substituierte und unsubstituierte Amine, einschließlich von C-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäuren und Peptiden, D- und anderen z. B. nichtproteinogenen bzw. substituierten Aminosäuren, die auch Bestandteile der Peptide sein können wie z. B. Sarcosin, N-Methylalanin, Dehydroalanin, Aziridincarbonsäure, Azetidincarbonsäure, Dehydroprolin, Aminobenzoesäure).

Bei der Einwirkung der wässrigen Lösung eines Stoffes der allgemeinen Formel mit solchen Resten  $R_1$  und  $R_2$ , die von dem betreffenden Zielenzym als substratanaloge Strukturen erkannt werden, auf das betreffende, im isolierten Zustand oder in biologischem Material befindliche Enzym wird eine zeitabhängige Inhibierung der Enzymaktivität unter Bedingungen erzielt, die für die übliche Wirkungsausprägung der Enzymaktivität charakteristisch sind und dabei von der Inhibitorkonzentration und der Struktur der Reste  $R_1$  und  $R_2$  abhängig ist.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen entfalten ihre Wirkungen derart, daß nach Bindung der Inhibitoren an das Zielenzym ein Rest  $R_2\text{-COO}^-$  abgespalten wird, und ein verbleibendes reaktives Intermediat mit den möglichen Strukturen  $R_1\text{-CON}$ ,  $R_1\text{-CONH}^+$  oder  $R_2\text{-NCO}$  durch Reaktion mit Gruppen im oder in der Nachbarschaft des aktiven Zentrums die weitere katalytische Aktivität des jeweiligen Enzyms blockiert wird. Diesen Typ der Inhibierung bezeichnet man als **mechanismus-orientierte Inhibierung** (Demuth, H.-U., Neumann, U., *Pharmazie* **44**, 1989, 1–11). Das Verfahren beruht darauf, daß die zur Modifizierung des Enzyms führende chemische Reaktion vorwiegend durch die katalytische Einwirkung des Zielenzym auf den Inhibitor erfolgt, so daß unspezifische Reaktionen mit anderen Biomolekülen weitestgehend vermieden werden können.

Inhibitoren der allgemeinen Formel zeichnen sich durch hohe Selektivität zwischen den Zielenzymen aus. Eine Variation dieser Spezifität, der Inhibierungsgeschwindigkeit, ihrer Lebensdauer in biologischen Lösungen und ihrer Penetrationseigenschaften kann durch die entsprechende Auswahl und Kombination der Reste  $R_1$  und  $R_2$  sowie deren Substituenten vorgenommen werden. Die nötigen synthetischen Operationen zur Bereitstellung der Reste  $R_1$ -COOH und  $R_2$ -COOH bzw.  $R_1$  und  $R_2$  erfolgen nach den dafür üblichen peptidchemischen Methoden (Wünsch, E., Synthese von Peptiden, Houben-Weyl, Band 15/I, Methoden der organischen Chemie, Müller, E., Hrsg., Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1974). Für die Verknüpfung dieser Ausgangsprodukte zu Inhibitoren analog Formel I werden neue Syntheseverfahren zur Anwendung gebracht.

Die erfindungsgemäß erhaltenen Diacyl Hydroxylamine entsprechend der allgemeinen Formel I oder deren pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexe können als irreversible Inhibitoren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Enzymen wie Proteinasen, Peptidasen, Lipasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen in deren gereinigter Form als auch in

normalen und pathologisch veränderten menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten, Organen und Geweben sowie Zellen und Zellkulturen, viralen, mikrobiellen, tierischer oder pflanzlicher Herkunft sowohl in vitro als auch in vivo hemmen und damit als hochwirksame Diagnostika, Zytostatika, Immunsuppressiva, Anti-Tumorpharmaka, antivirale Pharmaka, Anti-HIV-1-Pharmaka bzw. generell als Therapeutika bei Stoffwechsel- oder Regulationsprozessen zum Einsatz kommen, bei denen unerwünschte Aktivität oben näher spezifizierter Enzyme pathologische Veränderungen im jeweiligen Organismus induzieren.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1

Die Acylhydroxamsäuren als Ausgangsprodukte werden durch Behandlung der Säure  $R_1\text{-COOH}$  mit equimolarer Menge Carbonyldiimidazol und nachfolgender Zugabe von Hydroxylaminhydrochlorid dargestellt (Staab, H. A., Lüking, M., Dürr, F. H., Chem. Ber. 95 1962, 1275-1283).

Ohne weitere Reinigungsoperationen wird dann durch die Zugabe eines weiteren Äquivalents Carbonyldiimidazol und eines Äquivalents des Restes  $R_2\text{-COOH}$  unter Verwendung katalysierender Base (Pyridin, N-Dimethylpyridin) das gewünschte Endprodukt erhalten. Die säulenchromatographische Reinigung der Reaktionslösung an Silicagel bzw. Sephadex LH-20 und nachfolgende Kristallisation des Produktes aus Ethanol/Essigester, oder Essigester/Petrolether führt zum gewünschten Endprodukt der allgemeinen Formel I.

##### Beispiel 2

Das Syntheseverfahren dient der selektiven Einführung von Carbaminsäureresten ( $R_2$  entspricht Aminen, C-terminal geschützten oder ungeschützten  $\alpha$ -Aminosäuren oder Peptiden) in die Struktur der allgemeinen Formel I. Dabei wird Acylhydroxamsäure  $R_1\text{-CO-NHOH}$  gereinigt eingesetzt.

Durch Reaktion zwischen von 4-Nitrophenyl-chloroformiat mit der Aminokomponente  $R_2$  entsteht ein aktiviertes Carbaminsäureesterderivat der allgemeinen Formel:  $\text{Np-CO-NH-R'}$  oder  $\text{Np-CO-NR'R''}$ , wobei  $\text{NH-R'}$  und  $\text{NR'R''}$  dem Rest  $R_2$  der allgemeinen Formel entsprechen und neben Aminosäuren und Peptidderivaten auch aliphatische, verzweigte, heterocyclische oder aromatische Amine darstellen können. Np- ist der 4-Nitrophenylrest. Rühren eines Äquivalents Acylhydroxamsäure ( $R_1\text{-CO-NHOH}$ ) mit einem Äquivalent  $\text{Np-CO-R}_2$  bei  $0^\circ\text{C}$  in THF führt zur gewünschten Diacylhydroxamsäure, die analog der in Beispiel 1 beschriebenen Methoden gereinigt werden kann.

##### Beispiel 3

N-tert. Butyloxycarbonyl-Alanyl-Phenylalanyl-O-Acetyl

Hydroxylamin (Konzentrationsbereich  $1\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ ) wurde bei  $25^\circ\text{C}$  (in  $50\text{ mM}$  Tricinpuffer,  $\text{pH}7,6$ ) mit dem Enzym Subtilisin inkubiert und die Inaktivierung des Enzyms mittels des Testsubstrats N-Succinyl-Alanyl-Alanyl-Alanyl-Nitroanilid ( $10\text{--}500\text{ }\mu\text{M}$ ) verfolgt.

Die ermittelten Parameter der Inaktivierung betragen:

$K_i = 47\text{ }\mu\text{M}$  und  $k_{\text{inact}} = 0,003\text{ sec}^{-1}$ .

##### Beispiel 4

N-Carbobenzoxy-Phenylalanyl-Phenylalanyl-O-Methacryl

Hydroxylamin (Konzentrationsbereich  $10\text{--}1000\text{ nM}$ ) wurde bei  $25^\circ\text{C}$  (in  $50\text{ mM}$  Acetatpuffer,  $\text{pH}5,5$ ) mit dem Enzym Cathepsin L inkubiert und die Inaktivierung des Enzyms mittels des Testsubstrats N-Carbobenzoxy-Phenylalanyl-Arginyl-Methylcoumarinsamid ( $3\text{--}8\text{ }\mu\text{M}$ ) verfolgt.

Die ermittelten Parameter der Inaktivierung betragen:

$K_i = 90\text{ nM}$  und  $k_{\text{inact}} = 0,11\text{ sec}^{-1}$ .